

**Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* yang diasosiasikan
dengan *acute hepatopancreatic necrosis disease*
(AHPND) dengan metode *polymerase chain reaction*
(PCR)**



© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1. Ruang lingkup.....	1
2. Istilah dan definisi	1
3. Prinsip umum.....	2
4. Peralatan	2
5. Bahan	3
6. Prosedur kerja	3
7. Pengamatan hasil dan dokumentasi.....	5
8. Intepretasi hasil.....	5
9. Jaminan mutu	6
Lampiran A	7
Lampiran B	9
Lampiran C	10
Bibliografi.....	11

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *Vibrio parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat teknis pada tanggal 23-25 Juni 2014 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. KEP. 26/MEN/2013 tentang penetapan jenis – jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa, dan sebarannya.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah dilakukan jajak pendapat pada tanggal 30 Agustus 2014 sampai dengan 29 Oktober 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)

1. Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

2. Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan :

2.1

***acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) atau *early mortality syndrome* (EMS)**

penyakit infeksius pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang berumur kurang dari satu bulan masa pemeliharaan di tambak, ditandai dengan atrofi hepatopankreas dan perubahan warna pembungkus jaringan ikat hepatopankreas menjadi pucat, kekuningan atau putih

2.2

alikuot

pembagian menjadi beberapa ukuran yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

2.3

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribonucleic acid* (DNA) dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.4

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.5

denaturasi

pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

2.6

***deoxyribonucleic acid* (DNA)**

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.7

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik dari kultur bakteri atau jaringan udang

2.8

ekstensi

proses sintesis DNA baru yang komplemen terhadap DNA target dengan bantuan enzim DNA polimerase

2.9

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.10

fragmen gen sintetik

sekuen DNA yang diproduksi secara sintetis

2.11

koktail

larutan yang berisi berbagai komponen untuk proses amplifikasi

2.12

pelet

endapan yang terbentuk hasil sentrifugasi

2.13

plasmid

DNA ekstrakromosomal yang dapat bereplikasi secara otonom dan bisa ditemukan pada sel mikroba

2.14

supernatan

cairan hasil sentrifugasi

2.15

template

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

3. Prinsip umum

Mengisolasi DNA dari kultur bakteri atau jaringan udang yang diduga terinfeksi bakteri yang diasosiasikan dengan AHPND atau *early mortality syndrome* (EMS) untuk diamplifikasi.

4. Peralatan

- a) mesin PCR (*thermal cycler*);
- b) autoklaf;
- c) alat dokumentasi gel;
- d) alat elektroforesis gel agarose beserta *power supply*;
- e) bunsen;
- f) cawan petri;
- g) *freezer* (- 20 °C).
- h) jarum Ose;
- i) *laminar air flow cabinet*;
- j) *microwave* atau *hot plate magnetic stirrer*;
- k) mikropipet berbagai ukuran 0,2 µl - 1 000 µl;

- l) *mini mixer*;
- m) peralatan bedah;
- n) penangas air (*waterbath*) atau *heating block*;
- o) sentrifus (minimal 12 000 x g);
- p) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- q) transiluminator UV.

5. Bahan

- a) *agarose*;
- b) akuabides;
- c) 0,5 x bufer *Tris Boric EDTA* (TBE);
- d) 5 x bufer PCR;
- e) bufer *TE* (100 mM *tris-HCl*, 10 mM *ethylene diamine tetra acetyc acid / EDTA*);
- f) *dNTPmix*;
- g) etanol absolut p.a;
- h) fragmen-gen-sintetik sebagai kontrol positif : AP1 dan AP2;
- i) *lysis buffer*;
- j) 6 x *loading dye*;
- k) MgCl_2 ;
- l) marker DNA (100 bp DNA ladder);
- m) mikrotip ukuran 10 μl – 1 000 μl ;
- n) pewarna DNA;
- o) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- p) primer :
 - pasangan primer AP1: AP1F (5'-CCT TGG GTG TGC TTA GAG GAT G-3') dan AP1R (5'-GCA AAC TAT CGC GCA GAA CAC C-3')
 - pasangan primer AP2: AP2F (5'-TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG G-3') dan AP2R (5'-CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA G-3')
- q) *proteinase K* (10 mg/ml);
- r) *sodium dodecyl sulfat* (SDS);
- s) 3 M sodium asetat (CH_3COONa) pH 5,2;
- t) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2,0 ml;
- u) *trypticase soy broth* (TSB);
- v) *Taq DNA polymerase* (5 U/ μl).

6. Prosedur kerja

6.1 Pembuatan larutan dan media

Contoh pembuatan larutan dan media sesuai Lampiran A. larutan dan media komersial dapat digunakan setelah divalidasi.

6.2 Preparasi contoh uji

- a) gerus contoh uji berupa larva udang atau jaringan udang (saluran pencernaan, hepatopankreas) atau;
- b) larutkan 1 bagian hasil gerusan dengan 9 bagian TSB-NaCl kemudian inkubasikan pada 30 °C selama 4 jam menggunakan *shaker*;
- c) ambil 1,5 ml dari sediaan 6.2.b kemudian sentrifugasi pada 6 000 x g selama 3 menit - 5 menit dan buang supernatan, pelet siap diekstraksi.

6.3 Ekstraksi DNA dengan *lysis buffer*¹

- masukkan 20 mg contoh uji atau pelet sediaan ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- tambahkan 500 µl *lysis buffer* dan homogenkan;
- inkubasikan pada 95 °C selama 10 menit menggunakan *heating block* atau *waterbath*;
- sentrifugasi pada 12 000 x g selama 10 menit;
- pindahkan 200 µl supernatan ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru yang telah diisi dengan 400 µl etanol absolut dan 20 µl sodium asetat;
- homogenkan, kemudian sentrifugasi pada 12 000 x g selama 5 menit;
- uang supernatan dan keringkan pelet;
- larutkan pelet dengan 100 µl – 200 µl akuabides atau bufer TE.

CATATAN Diagram alur ekstraksi DNA digambarkan pada Lampiran A.

6.4 Amplifikasi

- cairkan (*thawing*) bahan koktail PCR dan DNA *template*, letakkan di atas es.
- buat preparasi koktail yang masing-masing menggunakan pasangan primer AP1 atau pasangan primer AP2 sesuai dengan Tabel 1 atau Tabel 2. Siapkan volume koktail 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan.

Tabel 1 Komposisi bahan koktail PCR

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
akuabides	14,875	-
5 x PCR <i>buffer</i>	5,0	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTP <i>mix</i> (10 mM)	0,5	200 µM
primer AP1F atau AP2F (10 µM)	0,5	0,2 µM
primer AP1R atau AP2R (10 µM)	0,5	0,2 µM
<i>Taq DNA polymerase</i> (5 U/µl)	0,125	0,625 U
DNA <i>template</i>	2,0	0,4 ng - 4,0 ng
Total	25	
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

Tabel 2 Komposisi bahan koktail PCR dengan *mastermix* komersial

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
akuabides	9,5	-
2 x <i>mastermix</i>	12,5	1x
primer AP1F atau AP2F (10 µM)	0,5	0,2 µM
primer AP1R atau AP2R (10 µM)	0,5	0,2 µM
DNA <i>template</i>	2,0	0,4 ng - 4,0 ng
Total	25	
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

- homogenkan semua bahan koktail dan distribusikan sebanyak 24 µl ke masing-masing tabung mikro 0,2 ml.

¹ prosedur ekstraksi RNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan kompatibel dengan bahan amplifikasi yang sudah divalidasi

- d) tambahkan 2 μ l DNA *template* contoh uji (10 ng -100 ng), sertakan contoh kontrol positif (fragmen gen sintetik) dan kontrol negatif.
- e) amplifikasi sesuai Tabel 3.

Tabel 3 Profil amplifikasi

Proses	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu	Siklus
<i>Hot start</i>	94	5 menit	-
Amplifikasi	94	30 detik	30
	60	30 detik	
	72	60 detik	
Ekstensi akhir	72	10 menit	-
<i>Hold</i>	4	sampai proses berikutnya	-
CATATAN Profil amplifikasi disesuaikan dengan bahan amplifikasi yang digunakan dan mesin PCR yang digunakan			

6.5 Elektroforesis

6.5.1 Persiapan

Contoh pembuatan bufer elektroforesis dan gel dapat dilihat pada Lampiran A.

6.5.2 Prosedur

- a) letakkan 1,5% gel agarose ke elektroforesis *chamber*.
- b) tambahkan larutan TBE 0,5 x ke dalam elektroforesis *chamber* hingga gel agarose terendam.
- c) siapkan 2 μ l *loading buffer* di atas parafilm sesuai jumlah contoh dan 1 marker.
- d) ambil contoh uji hasil PCR sebanyak 10 μ l dan campur dengan *loading buffer*.
- e) masukkan ke dalam sumuran dengan menggunakan mikropipet disertakan juga *marker* DNA sebanyak 2 μ l.
- f) masukkan contoh uji ke masing-masing sumuran kemudian pasang tutup elektroforesis *chamber* dan alirkan arus listrik dengan voltase 100 V -150 V.
- g) hentikan elektroforesis setelah pewarna biru-bromofenol mencapai 2/3 bagian panjang gel agarose.

7. Pengamatan hasil dan dokumentasi

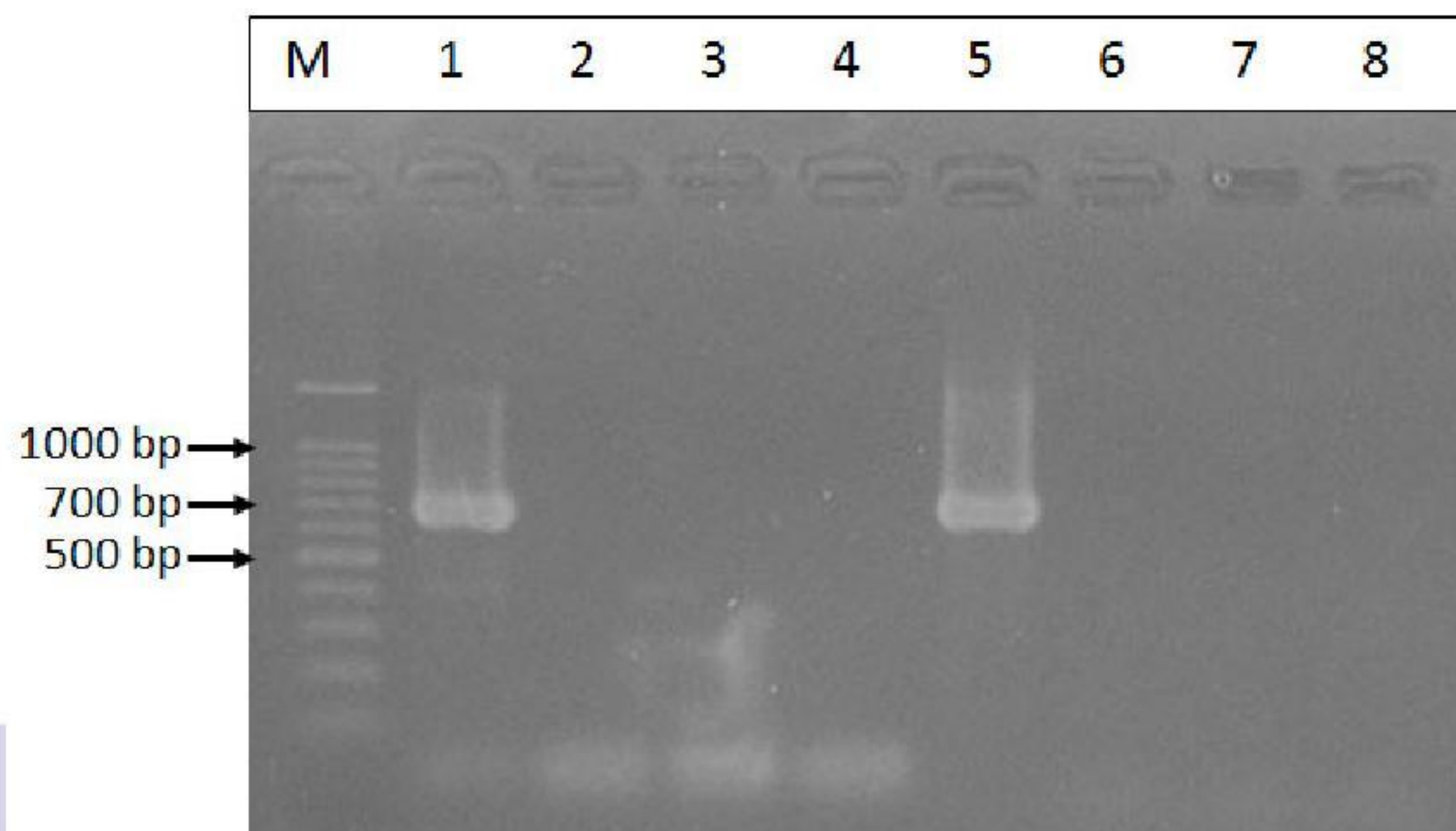
- a) setelah selesai proses elektroforesis, gel diangkat dari *chamber*;
- b) rendam gel dalam larutan zat pewarna DNA 0,05% selama 10 menit. Gunakan sarung tangan;
- c) rendam gel dengan akuades/ air mengalir selama selama 10 menit;
- d) amati dengan transiluminator UV dan dokumentasikan.

8. Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarose setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR menggunakan pasangan primer AP1 atau pasangan primer AP2 yang diamati dengan transiluminator UV, maka:

- kontrol negatif (blangko/akuabides): tidak terlihat adanya pita berukuran 700 bp;

- kontrol DNA negatif (DNA selain *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND): tidak terlihat adanya pita berukuran 700 bp;
- kontrol positif (fragmen gen sintetik *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND): terlihat adanya pita berukuran 700 bp;
- contoh uji negatif *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND: tidak terlihat adanya pita berukuran 700 bp.
- Contoh uji positif *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND: terlihat adanya pita berukuran 700 bp



Keterangan gambar:

M : Marker (100 bp DNA Ladder)

1 : Kontrol positif (fragmen gen sintetik *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND)

2 : Kontrol negatif (blangko/akuabides)

3 : Kontrol DNA negatif

4 : Contoh uji negatif *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND)

5 : Kontrol positif (fragmen gen sintetik *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND)

6 : Kontrol negatif (blangko/akuabides)

7 : Kontrol DNA negatif

8 : Contoh uji negatif *V. parahaemolyticus* yang diasosiasikan dengan AHPND

1 – 4 : hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer AP1

5 – 8 : hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer AP2

Gambar 1 - Hasil deteksi bakteri yang diasosiasikan dengan AHPND

CATATAN Hasil analisis PCR yang dinyatakan positif harus diikuti informasi patologi, histopatologi dan dikonfirmasi dengan uji postulat Koch yang diulang sebanyak 3 kali

9. Jaminan mutu

- hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,0.
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan 2 kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

Lampiran A
(informatif)
Contoh pembuatan larutan dan media

A.1 Larutan 0,5 M Tris- HCl

Cara membuat :

- a) larutkan 121,1 g *Tris base* dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan 70 ml atau 42 ml HCl pekat untuk mendapatkan pH 7,4 atau 8,0;
- c) biarkan larutan dingin pada 25 °C – 30 °C sebelum pengaturan pH terakhir;
- d) tambahkan akuades hingga 1 l;
- e) alikuot dalam beberapa botol;
- f) sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.2 Larutan 5 M NaCl

Cara membuat:

- a) larutkan 292 g NaCl dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan akuades sampai 1 l;
- c) alikuot dalam beberapa botol;
- d) sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.3 Larutan 2,5 M CaCl₂

Cara membuat:

- a) larutkan 11 g CaCl₂.6H₂O dalam akuades hingga volumenya 20 ml;
- b) saring larutan dengan filter 0,22 µm;
- c) alikuot 1 ml dan simpan pada 4 °C.

A.4 Larutan 10 mg/ml Proteinase K

Cara membuat:

- a) larutkan 100 mg proteinase K ke dalam larutan steril yang mengandung 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) dan 5 mM CaCl₂ hingga volumenya 10 ml (campur 8880 µl akuades, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 7,4 dan 20 µl 2,5 M CaCl₂);
- b) alikuot 1 ml dan simpan pada -20 °C.

A.5 Larutan 0,5 M *disodium ethylene diamine tetra acetate* (Na-EDTA) pH 8

Cara membuat:

- a) tambahkan 186,1 g Na-EDTA.2H₂O dalam 800 ml akuades.
- b) homogenkan dengan *magnetic stirrer*.
- c) tambahkan NaOH secara bertahap sambil dihomogenkan (±20 g NaOH pelet) hingga mencapai pH 8.
- d) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.6 Larutan 10 % *sodium dodecyl sulphate* (SDS)

Cara membuat :

- a) larutkan 100 g SDS *electrophoresis grade* ke dalam 900 ml akuades.
- b) panaskan pada 68 °C untuk melarutkan SDS.

- c) tambahkan beberapa tetes HCl pekat hingga mencapai pH 7,2.
- d) tambahkan akuades hingga 1 liter dan masukkan ke dalam botol reagen.
- e) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.7 Larutan 0,5 µg/ml pewarna DNA

Cara membuat :

- a) tambahkan 5 µl larutan pewarna DNA 10 mg/ml ke dalam 100 ml bufer TBE.
- b) simpan di tempat yang gelap agar larutan pewarna DNA lebih awet .

A.8 Larutan 3 M sodium asetat pH 5,2

Cara membuat :

- a) larutkan 408,1 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dalam 800 ml akuades.
- b) tambahkan asam asetat glasial hingga mencapai pH 5,2.
- c) tambahkan akuades sampai 1 l.
- d) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.9 bufer TBE 5x dan 0,5x

Cara membuat TBE 5x:

- a) masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker glass* berkapasitas 1 l.
- b) masukkan 54 g *Tris base* dan 27,5 g asam borat ke dalam *beaker glass* yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai terlarut.
- c) tambahkan 20 ml 0,5 M EDTA, homogenkan.
- d) tambahkan akuades sampai 1 l.
- e) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

Cara membuat TBE 0,5 x:

campurkan 1 bagian TBE 5 x dengan 9 bagian akuades

A.10 Gel Agarose 1,5%

Cara membuat :

- a) larutkan 1,5 g agarose dalam 100 ml bufer TBE 0,5 x.
- b) didihkan hingga larutan menjadi bening.
- c) tuang gel agarose pada cetakan dengan sisir terpasang, setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C.

A.11 Lysis buffer

Cara membuat :

- a) campurkan 69,7 ml akuades; 10 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0); 200 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0); 10 ml NaCl 5 M; dan 10 ml SDS10%.
- b) tambahkan 100 µl Proteinase K 10 mg/ml sesaat sebelum digunakan, untuk mendapatkan larutan dengan kadar akhir Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM, NaCl 500 mM, SDS 1%, dan *Proteinase K* 10 µg/ml.

A.12 Trypticase soy broth NaCl (TSB-NaCl)

Cara membuat :

- a) larutkan 15 g NaCl dan 30 g TSB dalam 1 l akuades, kemudian didihkan.
- b) Masukkan 5 ml larutan ke dalam setiap tabung reaksi.
- c) Autoklaf pada 121 °C selama 15 menit

Lampiran B
(informatif)
Diagram alur ekstraksi DNA dengan *lysis buffer*



Lampiran C
(normatif)
Sekuen DNA fragmen gen sintetik

C.1 AP1:

5'-CCTTGGGTGT GCTTAGAGGA TGATGAAGAT GACTATGTCC TCGAACGATT
TGAGTTGCGA GTTCACGGTC GTAAACCACT CGTTCTCAAT CGCCCCTCGT
TTTCCAAACT CATGTTTCGTC ACCCAGCAGT ATCTCCACAC GTCACAGGAA
ACCACCAAGC GAATATTAAG AGCCACCATC TTAGAAAGTG CTGAGCCCTT
CACGGCGGAT GAACACTGCC GATTGGTCTC TGCACTCGAA AGGCACTTAG
CTGACGTCCA TGAATGAAAA AACCCGATAA CATCATCATG TTATCGGGCT
ATTTGGTGTC ATCAGTGTGT TTGTGTTTGG CGGTTTTACA ACCATTCTTC
AGCACATTCA TGTGTTATCG CATCAGTGGT TTCAGTGATC GTGGCAGACT
GAAACCCGCC GACGATGGGA TTTAACGCTA AATTCGCTAC TCTCTTCGCC
TCATCAAAGC AAGGAAGCAC TGCAACGTAC TCCTTACCCC AACTCACTTC
AAGCGTAACT CGGCAAGCAC CTTTATACCC AACCGAAACA TGAACCTCTG
CATCAAGCCG GTGTTTCATCG CCGTTCAATA ATGAATTCAT CAGCGCGCCC
TCGTTAAAGA GCATTAGAAG TGATGCACTG GAATGTTAAA CCAACACACC
AATGCATCGT AGAACGCCGA AATAACAGGG TGTTCTGCGC GATAGTTTGC-
3'

C.2 AP2:

5'-TCACCCGAAT GCTCGCTTGT GGCTCAGCGA GCATGGGGTTC
ACGCCTCTAT AAGTGCAAAA ACTCTGGCTG TACCTACTAC ACCAAATACC
TCAATCAAAG CTGTAAGTCT CGAGCTTGCT GCAGTGGTGG CGTCAAATCC
ACCGAAAGGT GGATGGTTGC TTAATCGATT ATTCAAATGC GCGTCCAACA
TTTTAACGAC TTGGGCGAAA CGGCAAGACT TAGTGTACCC AGAGCCAAAA
CCTCATCGAA AATCAGGATT GTTGCTTCCT ACGTTGAAAG ACCGGCGTTA
TCAGCTTCAT ATCCCCCACC TCTGTCACGC CTGCGTGGAT CGCTGAATGA
CTGTAAAAAA TGACAATAAA GATTGATCAA TCTCAGAAAC GTTTTGGGAC
AAAAATGGTT CAACAATATC TGCTGGGTAT GTGGCTATCC AAACAATATT
CTTGATAAAG GCTGGGAAAT GGAAAATTCA CTCTCCAAAT ACACCAAATT
AGTACAGAAA TTTATACAAT TACAGTAACA TGAATCCGTC ATACTGGCAG
CAAGGAGTTC ATGTGAGCCA ACAAGAAGAA AAATACCCGG CCAGCGCCAT
ATCCTCCTGG AGCGGCTTTG TTTACCAAGG AAAAGTCGCA CTATATCACT
CACTTAAGCT TATTCTCGAT GATGATTGG ACTTCGAACT TCAGCTAGAC
AGTAGCGACG-3'

Bibliografi

Flegel, T.W. & C-F. Lo, 2013. *Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)*.
Alamat web???

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3*. CSHL Press. New York

